

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-340701

(43)Date of publication of application : 13.12.1994

(51)Int.Cl.

C08B 37/00  
 A23L 1/30  
 A23L 1/308  
 A61K 31/715  
 A61K 31/715  
 A61K 31/715  
 C12P 19/04  
 //(C12P 19/04  
 C12R 1:645 )

(21)Application number : 05-154139

(71)Applicant : NIPPON OIL CO LTD

(22)Date of filing : 01.06.1993

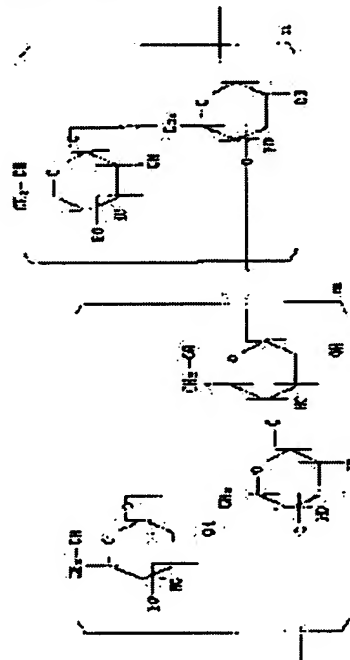
(72)Inventor : WATANABE KIMIKO  
 UCHIYAMA YOKO  
 KIYOTA TAKASHI  
 YAGISHITA KAZUHIRO

## (54) HIGHLY BRANCHED BETA-GLUCAN, ITS PRODUCTION AND USE

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To provide a highly branched  $\beta$ -glucan having specific physicochemical characteristics, an antitumor activity and an immune-activating activity, and useful for medicines, food additives, feed additives, etc., by adding an organic solvent to the culture solution of *Aureobasidium pullulans* IFO 4466 strain.

**CONSTITUTION:** The highly branched  $\beta$ -glucan is obtained by inoculating *Aureobasidium pullulans* IFO 4466 strain on a liquid medium containing xylose and vitamin C as essential ingredients, and subsequently collecting the product from the culture supernatant. The  $\beta$ -glucan is expressed by the structural formula (m is 80-30%; n is 20-70%), has a number-average mol.wt. of 10000-5000000 (measured by a gel permeation method), has absorption characteristic to a  $\beta$ -glucoside bond orientation at a wavelength of  $880\text{cm}^{-1}$  in an IR absorption spectrum (KBr method), and has signals at positions near to  $\delta$  values of 68, 86, 103ppm in a  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, the strength of a signal at a  $\delta$  value of 61ppm being 1.2-3.0 times that of 60.5-60.8ppm, and the strength of a signal at a  $\delta$  value of 85.7ppm being 1.2-3.0 times that of 83.2ppm.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.04.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than

the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3444624

[Date of registration] 27.06.2003

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-340701

(43) 公開日 平成6年(1994)12月13日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/00	P	7433-4C		
A 2 3 L 1/30	B			
1/308				
A 6 1 K 31/715	ABD			
	ADU	9454-4C		

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-154139	(71) 出願人	000004444 日本石油株式会社 東京都港区西新橋1丁目3番12号
(22) 出願日	平成5年(1993)6月1日	(72) 発明者	渡邉 君子 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内
		(72) 発明者	内山 祥子 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内
		(72) 発明者	清田 隆 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内
		(74) 代理人	弁理士 藤野 清也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高分岐度β-グルカン、その製造法及び用途

(57) 【要約】

【構成】 オウレオバシディウム ブルランス (*Aureobasidium pullulans*) IF04466菌株の培養上清から得られる、β-1,3結合グルコース残基を主鎖として、これにβ-1,6結合グルコース残基の分岐鎖を多数側鎖として有する数分子量1万~500万の高分岐度β-グルカン、その製造法及び用途。

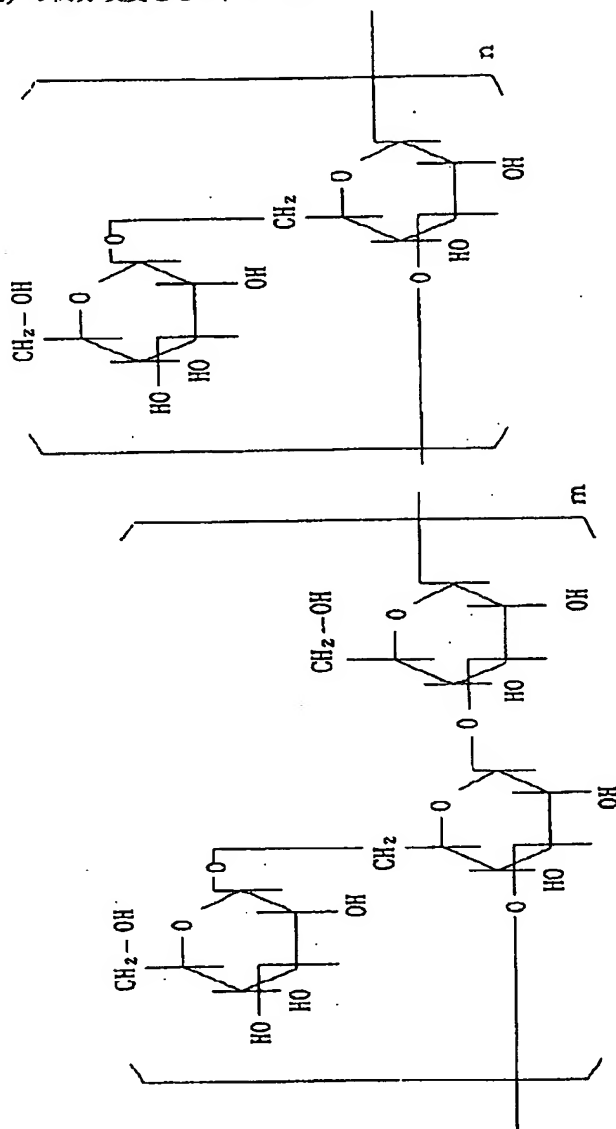
【効果】 経口的に高い抗腫瘍活性及び免疫賦活活性を有し、医薬、食品添加物、飼料添加物等として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の構造式で示され、数平均分子量1万～500万（ゲル濾過法で測定）の高分岐度をもつβ-グル\*

\*ルカン。

【化1】



（ただし、式中mは80～30%、nは20～70%を示す）

【請求項2】 オウレオバシデウム プルランス (*Aureo basidium pulluans*) I F O 4466 株の培養上清に有機溶媒を添加して沈澱を生じさせることによって得ることができ、次の理化学的特性を有する高分岐度β-グルカン。

- 1) 数平均分子量1万～500万（ゲル濾過法による測定）、
- 2) 赤外吸収スペクトル（KBr法）で波長  $880\text{cm}^{-1}$  にβ-グルコシド結合配向に特徴的な吸収がある、
- 3)  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルで
  - i) δ値68ppm, 86ppm, 103ppm付近にシグナルを有する。

ii) δ値61ppmのシグナルの強度が60.5～60.8ppmのその1.2～3.0倍である。

iii) δ値85.7ppmのシグナルの強度が86.2ppmのその1.2～3.0倍である。

【請求項3】 キシロースおよびビタミンCを必須成分として含む液体培地に、オウレオバシデウム プルランス (*Aureobasidium pulluans*) I F O 4466株を接種して培養し、得られる培養上清から高分岐度β-グルカンを採取することを特徴とする請求項1記載の高分岐度β-グルカンの製造法。

【請求項4】 請求項1または2記載の高分岐度β-グルカンを有効成分とする感染症予防剤。

【請求項5】 請求項1または2記載の高分岐度β-グルカンを含む有効成分とする抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、高分岐度β-グルカン、その製造法及び感染症予防剤あるいは抗腫瘍剤に関する。本発明の感染症予防剤あるいは抗腫瘍剤は、医薬あるいは食品添加剤、飼料添加剤などとして有用である。

【0002】

【従来の技術】従来、オウレオバシディウム属(*Aureobasidium* sp.)がβ-1, 3-1, 6-D-グルカンを生成することは知られていた(*Acta Chemica Scandinavica* 17, 1351-1356(1963)、*Agric. Biol. Chem.* 47 (6), 1167-1172(1983))。これらのグルカンはリン酸基、リンゴ酸基またはスルホン酸基が付いており、活性を高めるためにはこれらの官能基を取り除かなければならないという問題があった。一方、多数分岐を有するのグルカンも知られているが(*Chem. Pharm. Bull.*, 40, 2215(1992))、分岐のない主鎖のグルコース単独同志の結合が多数存在しているものであり、またこのグルカンは抗腫瘍活性を有していないものであった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、このようなオウレオバシディウム属の産生する高分子多糖に注目し、新規で、かつさらに生理活性の高いβ-グルカンを得ようとして検討を重ねたところ、オウレオバシディウム ブルランス IFO 4466 株が高分岐度のβ-グルコシド結合をもつ新規グルカンを産生し、このグルカンがリン酸基等と結合しないグルコースのみからなる多糖で経口的に高い抗腫瘍活性及び免疫賦活作用を示すことを見出して本発明を完成するに至った。

【0004】従って、本発明の課題は、新規な高分岐度のβ-グルコシド結合をもつグルカンを提供することにある。また、本発明の課題は、オウレオバシディウム ブルランス IFO 4466株を用いる新規な高分岐度β-グルカンの製造法を提供することにある。さらに本発明の課題は、このような新規な高分岐度β-グルカンを有効成分とする抗腫瘍剤及び感染症予防剤を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明者らは、前記したようにオウレオバシディウム属の産生する多糖について注目し、オウレオバシディウム属に属する種々の微生物を用いて多糖の産生について検討を重ねたところ、オウレオバシディウム ブルランス IFO 4466 株がキシロースおよびビタミンCを必須成分として含有する液体培地において高い収率で生理活性が高く、高分岐度のβ-グルコシド結合をもつβ-グルカンを産生することを見出した。

【0006】本発明をさらに具体的に説明する。オウレオバシディウム属には、森永力著「講座／真菌の分類・同定②」(*J. Antibact. Antifung. Agents.* 18 (6) 295-297(1990))によれば、14種1変種があり、そのほとんどがオウレオバシディウム ブルランス(*Aureobasidium pullulans*)である。オウレオバシディウム ブルランスには2つの変種がある。これらの形態的特徴は、コロニーは滑面でしばしば粘性のある分生子の塊りで被われ、通常、気中菌糸はまばらに存在する。コロニーの色は明るい褐色、黄色、ピンクあるいは黒色とさまざまである。菌糸は透明、しばしば褐色になり厚壁である。分生子形成細胞は透明で、菌糸上に分岐して先端にあるいは中間部にそれぞれ形成される。分生子は同調的に出芽法により、分生子形成細胞上から密に作られる。色は透明・滑面壁で単細胞、形や大きさはさまざまである。これらのオウレオバシディウム ブルランスのなかで天然から分離して純化、継代培養してその形質を保持しているものあるいは寄託機関に寄託されている菌株のうち、本発明の高分岐度β-グルカンを産生することができるものであれば、どのような菌株でも用いられる。しかし、財団法人 発酵研究所に寄託されているオウレオバシディウム ブルランス IFO 4466を使用することが高分岐度β-グルカンの収率及び単離しやすさの点で好ましい。

【0007】本発明で使用する培地は、炭素源、窒素源、リン、カリウム、マグネシウム等の通常微生物の培養に必要な栄養成分を含む液体培地が用いられる。炭素源としては少なくともキシロースおよびビタミンCを必須成分として用いる。炭素源として、これ以外に例えばグルコースやシュクロースを用いることができる。使用割合は炭素源としてキシロース5~150g/L、好ましくは10~100g/L、最も好ましくは20~60g/L、ビタミンC 0.01~100g/L、好ましくは0.1~60g/L、最も好ましくは0.5~20g/L が用いられる。炭素源以外の成分の使用割合はNaNO<sub>3</sub> 0.5g/L~20g/L、好ましくは1~10g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05~10g/L、好ましくは0.1~5g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0~20g/L、好ましくは0.5~5g/L、KCl 0.1~10g/L、0.2~5g/L、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.05~5.0g/L、好ましくは0.1~2.0g/L、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0~5g/L、好ましくは0.005~2.0g/Lが用いられる。また本発明の液体培地にビタミンB<sub>1</sub>を添加することもできる。培養は、通常、温度5~40℃で1~10日間培養する。好ましくはは通気下で行う。こうして培養液中に本発明の高分岐度β-グルカンが産生される。

【0008】培養終了後、培養液に遠心分離等の手段を施して培養液から菌体を除去し、培養上清から本発明の高分岐度β-グルカンを採取する。採取方法としては培養上清に有機溶媒を加えて本発明の高分岐度β-グルカンを沈澱させる方法を好ましく用いることができる。有機溶媒として特に制限はないが、例えばアルコール、ケ

トン、ニトリル等が用いられる。具体的にはエタノール、イソプロピルアルコール、アセトンやアセトニトリルなどが挙げられるが、特にエタノールが好ましい。得られる生成物は、本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンのほかに、通常、低分子化合物、タンパク、水不溶性のグルカン等の不純物を含有している。本発明において本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを食品添加剤あるいは飼料添加剤として用いるときは、前記生成物をそのままあるいは乾燥して用いることができる。

【0009】しかし、医薬品等の有効成分として用いる場合は、セルロースチューブなどを用いて透析を行って低分子化合物を除去し、また、トリクロロ酢酸、ピクリン酸などの酸性物質あるいは、 $n$ -ブタノール、 $n$ -ブタノールのクロロホルム溶液等の有機溶剤を除タンパク剤として用いてタンパクを沈澱除去する。さらに、高分岐度 $\beta$ -グルカンの沈澱に、0.5M程度のアルカリ水溶液を加えてこの沈澱を溶解し、不溶性のグルカンを沈澱除去し、水可溶性のグルカンだけを酢酸、クエン酸、塩酸、硫酸などの酸で中和して精製された高分岐度グルカンを得る。不純物除去操作で使用した薬品は、透析、ゲル透過、限外濾過などによって除去して純度が高い本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを得ることができる。

【0010】このようにして得られた高分岐度 $\beta$ -グルカンの理化学的性質を示すと次のとおりである。

【0011】(1) 構成単糖

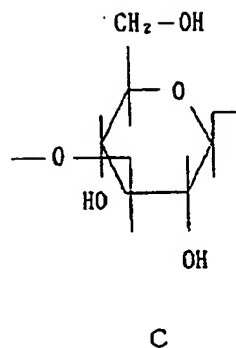
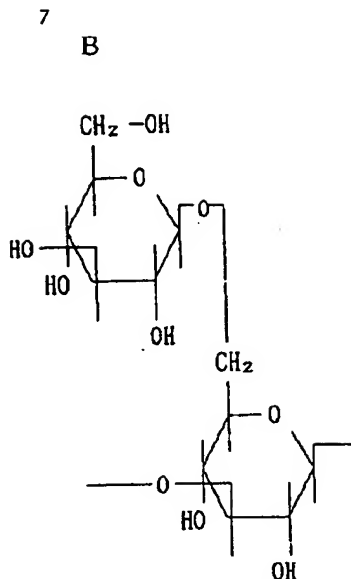
前記高分岐度 $\beta$ -グルカン50mgに1N硫酸2mlを加えて8時間加熱して加水分解を行い、その後常法に従って水素化ホウ素ナトリウムにより還元した上、ビリジンと無水酢酸とによりアセチル化し、ガスクロマトグラフィー(カラム: 3重量%ECNSS-M/クロモソルブ W温度: 190℃ キャリアガス: 窒素ガス、キャリアガス流量: 3ml/分)により分析したところ、比旋光度 $[\alpha]$ <sub>D</sub><sup>25</sup>は+50°であり、D-グルコース〔文献値 $[\alpha]$ <sub>D</sub><sup>25</sup>+52.8 (広川書店発行「有機定性分析」第276頁)〕のそれとほぼ一致することから99%以上がグルコースであることが認められた。さらに、また本発明の高分岐度 $\beta$ -

ルカンを、市販のキラターゼを精製して得られたエキソ $\beta$ -グルカナーゼにより酵素分解を行い、分解糖を薄層クロマトグラフィー(TLC)で調べた。この精製酵素はグルコースの $\beta$ -1,3結合のみからなるラミナリンに作用させ、TLCで分解糖を調べるとグルコースのみが検出されるが、本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンから得られた分解糖はグルコースおよびゲンチオビースと同じRF値を持っていた。しかもグルコース1に対し、ゲンチオビースが2以上であった。また酵素による分解速度はラミナリンの分解速度の1/20であったことから主鎖の $\beta$ -1,3結合の切断は分岐鎖により立体障害を受けたことが判明した。このようにして得られた酵素分解物と、前記酸分解物とをHPLC分析(カラム:  $\mu$ Bondasphere-NH<sub>2</sub> 5 $\mu$  100Å、溶媒: 80%CH<sub>3</sub>CN、流速: 0.8ml/ml、検出: 示差屈折計による)によって分解糖を定量したところ酵素による分解率は酸による分解率の1%以下であって、酵素により非常に分解されにくいことを示した。

【0012】(2) グルコースの結合様式及び分岐度  
本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを100℃でジメチルスルホキシド(DMSO)- $d_6$ に溶解し、100℃に保持したまま測定した<sup>13</sup>C NMRスペクトルの1例を図1に示す。図1に示すように(i) $\delta$ 値68ppm域に、化3に示されるグルコース残基A中のC-6の炭素に帰属するピークS<sub>1</sub>、(ii) $\delta$ 値86ppm域に化3に示される前記グルコース残基A及びグルコース残基C中のC-3の炭素に帰属するピークS<sub>2</sub>、及び(iii) $\delta$ 値103ppm域に化3に示されるグルコース残基A、B及びC中のC-1の炭素に帰属するピークS<sub>3</sub>の3個のシグナルが認められる。このことから、本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンは、 $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3結合を介して結合した前記AあるいはCからなる主鎖に $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6結合を介して結合した前記Bが分岐しているものと判断される(Carbohydrate Polymers 2, 135-144 (1982) 参照)。

【0013】

〔化2〕



A

【0014】また、図1を拡大すると、図2にみられるように $\delta$ 値60.5~60.8ppm域にグルコース残基C中のC-6の炭素に帰属するシグナル $S_c$ の強度が1に対し、 $\delta$ 値61.0ppm域のグルコース残基BのC-6の炭素に帰属するシグナル $S_b$ の強度が約2であるから本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカン中には主鎖のグルコース残基3個に対して分岐したグルコース残基が2個存在する。

【0015】さらに、 $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) 結合のC-3炭素に帰属するシグナルが検出される領域の拡大スペクトルを図3に示す。図3において $\delta$ 値 85.7 ppm のシグナル $S_a$ は、HSQC-TOCSY〔吉岡書房発行「エルンスト二次元NMR」第 589頁(1991年)及び丸善発行、日本化学会編「実験化学講座」第5巻第 133-137頁(1991年)〕で、グルコース残基AのH-6水素のシグナル( $\delta$ 値 3.58 および4.08ppm)との相関が観測されることから、グルコース残基AのC-3炭素に帰属される(Carbohydrate Polymers 2, 135-144(1982)参照)。残りの $\delta$ 値 86.2 ppm のシグナル $S_b$ はグルコース残基CのC-3炭素に帰属される。さらに本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンは、スクレログルカンやラミナリンのようなグルコース残基Cが連続するユニットを部分構造として持つ

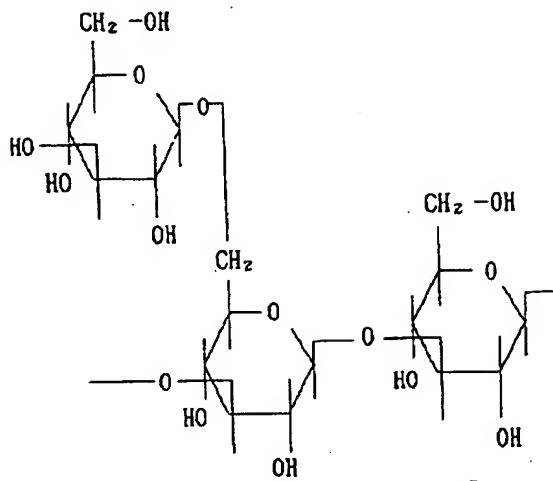
グルカンで観測されるはずの $\delta$ 値 85.9 ppm のC-3炭素に相当するシグナルが検出されないことから、本発明の高分岐度グルカン中のグルコース残基CはそのC-3炭素側に必ずグルコース残基Aが結合するものである。 $S_a$ と $S_b$ のシグナル強度比が2:1であることから、この例による本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンは化4に示す構造のユニットGIおよびGIIで構成され、GIとGIIの存在比は1:1であることがわかる。例えばDMSOを用いて室温で分別処理すると本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンはDMSOに溶解する成分と不溶の成分があり、図4に示すスペクトル中のシグナル $S_a$ と $S_b$ の面積強度比からDMSOに溶解する成分は主鎖のグルコース残基が9個に対して分岐したグルコース残基が5個から成る $\beta$ -グルカンであり、DMSOに不溶な成分は主鎖のグルコース残基が4個に対して分岐したグルコース残基が3個から成る $\beta$ -グルカンである。すなわち、本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンはGIIユニットを20~70%含有する。

【0016】

【化3】

9

B



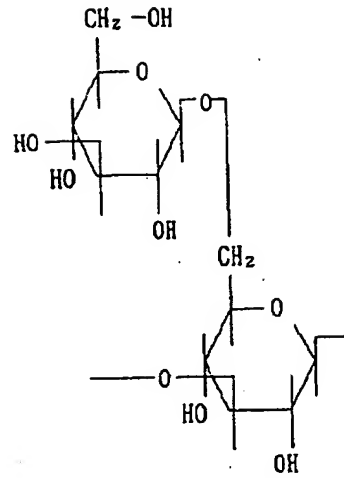
A

C

G I

10

B



A

G II

【0017】(3) 赤外吸収スペクトル(KBr法)  
図5に示すように波長  $880\text{cm}^{-1}$  に $\beta$ -グルコシド結合配向に特徴的な吸収(P)がある。

【0018】(4) 分子量(ゲル濾過法)  
数平均 1万~500万、好ましくは50万~500万

【0019】(5) 呈色反応: モーリッシュ反応、ア

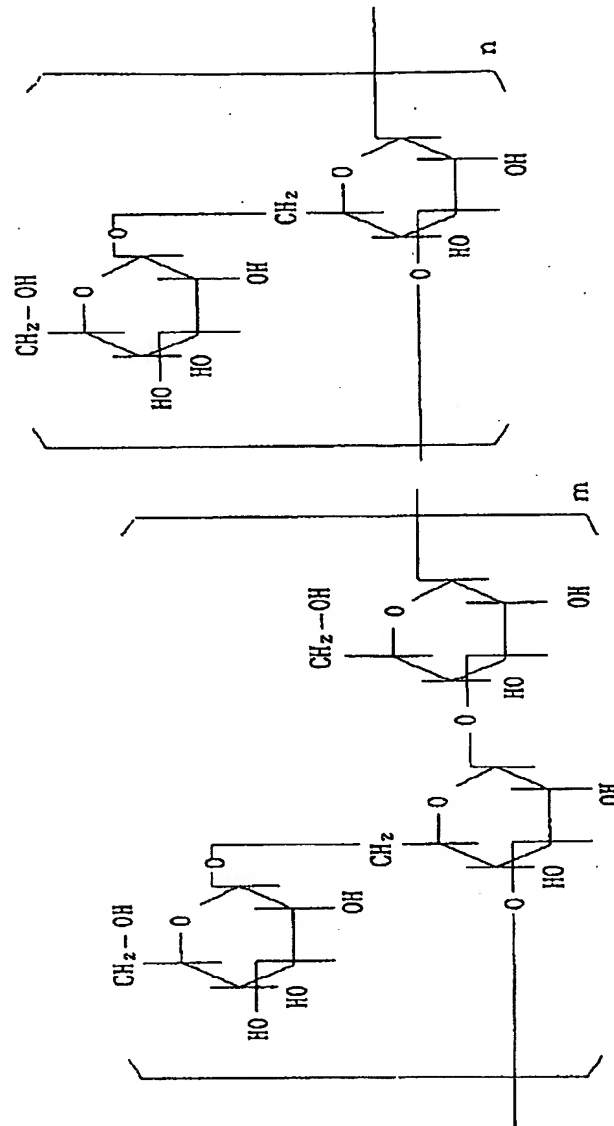
ンスロン硫酸反応、フェノール硫酸反応; 陽性  
ニンヒドリン反応、ビュレット反応; 陰性。

【0020】以上より理化学的性質から本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンの化学構造は次の通りと決定された。

【0021】

【化4】





(mは80~30%、nは20~70%を示す)

【0022】本発明の高分岐度β-グルカン、β-1,3結合のグルコース残基を主鎖とし、このグルコース残基にβ-1,6結合グルコース残基を分岐して多数有し、分岐のないグルコース同志の結合は実質的に主鎖に存在しない点に特徴がある。

【0023】本発明の高分岐度β-グルカンの抗腫瘍活性について、このグルカンを生理食塩水に溶解して経口又は非経口で担癌マウスに投与して試験したところ、実施例で示すように腫瘍の増悪を抑制し、延命率を向上させることができた。また免疫賦活性を有する。

【0024】従って、本発明の高分岐度β-グルカンは経口あるいは非経口投与によって抗腫瘍活性あるいは免疫賦活性を示し、医薬としてあるいは食品添加剤、飼料添加剤として用いることができる。医薬として用いる

場合は抗腫瘍剤あるいは免疫賦活性剤として、症状、年齢、性別等によって異なるが成人1日100~0.1mg、好ましくは30~60mgを1日に数回に分けて投与するとよい。この高分岐度β-グルカンはこのままの状態では医薬になり得るが、製薬上の習慣に従って製薬的に許容し得る希釈剤及び/または他の薬理作用をもつ他の物質と混合物として組成された状態で用いることもできる。投与は、経口投与、静脈内投与、腹腔投与、経腸投与等によって行うことができる。従って、このような投与のために好適な適宜の剤製、例えば散剤、顆粒、錠剤、糖衣錠、カプセル、ビル、坐剤、懸濁剤、液剤、乳剤、注射剤、エアゾール剤等として用いることができる。しかし、特に、腫瘍の転移防止剤として経口投与が有効である。

【0025】また、食品添加剤あるいは飼料添加剤とし

て用いる場合には、本発明の前記した沈澱あるいは高分岐度 $\beta$ -グルカンをもそのまま、あるいはこれらの添加剤に常用される担体、増量剤等と混合して食品あるいは飼料に添加し、食品、飼料に抗腫瘍活性を付与したりあるいは免疫賦活活性を付与して感染症を予防または治療したりすることができる。たとえば、ウシ、ブタ、ニワトリ、魚、鳥、イヌ、ネコ等の飼料添加剤として好適である。

【0026】次に本発明を実施例を示して具体的に説明する。

#### 【実施例1】

##### 高分岐度 $\beta$ -グルカンの製造

##### 1. 菌体培養

オウレオバシディウム ブルラン (*Aureobasidium pullulans*) 財団法人発酵研究所寄託番号IFO 4466株のポテトデキストロース寒天斜面培地に培養し、保存されていた菌株を、次の組成を有する液体培地(pH5.0-6.0、好適にはpH5.5)300 mlを坂口フラスコに入れたものに接種して温度20~30℃で2~3日間通気攪拌培養を行った。

本発明に用いた培地の組成の例

キシロース	30g
ビタミンC	6.0g
NaNO <sub>3</sub>	2.5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0g

\*

炭 素 源	添 加 量	生 産 量 (g/L)	
		高 分 岐 度 $\beta$ - グ ル カ ン	ブ ル ラ ン
グ ル コ ース	30 g / kl	0.6	0.6
シュ ー ク ロ ース	30 g / kl	0.7	0.7
キ シ ロ ース	30 g / kl	1.2	trece

【0029】このようにして得られた高分岐度 $\beta$ -グルカンの理化学的性質を検討したところ、前に示した高分岐度 $\beta$ -グルカンのそれと一致した。

#### 【0030】

【実施例2】実施例1で得られた高分岐度 $\beta$ -グルカンの抗腫瘍活性を測定した。ICRマウス(雌、約30g)14匹または7匹に同種移植瘍 Sarcoma 180をそけい部皮下に細胞数 $5 \times 10^6$  移植した。飼料及び水は自由に摂取させた。移植7日目に本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカン2.※

※5mgを生理食塩水1mlに溶解し、これを体重kg当り40mgになるように1日1回腹腔内に投与した。移植5週目に腫瘍を摘出し、その重量を測定し、生理食塩水のみを投与した対照群との比較を行った。その結果を表2に示した。表2にみられるように、本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを腹腔内に投与することによって高い抗腫瘍活性が認められた。

#### 【0031】

##### 【表2】

グ ル カ ン	投 与 量 mg / 体重 kg	腫 瘍 重 量	増 殖 抑 制 率 %	完 全 退 縮
対 照	0	9.6 $\pm$ 7.7	0	0 / 14
本 発 明 グ ル カ ン	40	0.75 $\pm$ 1.1	92	1 / 7

#### 【0032】

【実施例3】実施例1で得られた高分岐度 $\beta$ -グルカンの免疫賦活活性を測定した。ICRマウス(雌、約30g)

50 に本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカン3mgを生理食塩水1mlに溶解し、これを体重kg当り20mgになるように腹腔内投与した。飼料および水は自由に摂取させた。投与開始後

* KCl	0.5g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01g
ビタミンB <sub>1</sub>	1mg
蒸留水	1 L

オウレオバシディウム ブルラン IFO 4466 株は糖としてグルコースや蔗糖を用いるとブルラン( $\alpha$ -1,4-1,6-グルカン)も生成するが糖としてキシロースを用いるとブルランの生成はほとんど見られず、本発明の高分岐度 $\beta$ -グリカンを生成する(表1参照)。

#### 【0027】

##### 2. 本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンの製造

上述の培養液 300mlを遠心分離機を用いて菌体を取り除き、得られた培養上清に同量のエタノールを加えて室温で数時間攪拌した。次に遠心分離を行い、得られた沈澱物に 300mlの0.5N NaOHを加えて室温で攪拌して水に不溶性のグルカンを沈澱させ、この沈澱を遠心分離により取り除いた。この不溶物を取り除いた液を、セルロースチューブなどによる透析を行った。なお、微量のタンパクを除去する必要がある場合には透析前にトリクロロ酢酸を粗沈澱物水溶液に加えてタンパクを沈澱除去する。高分岐度 $\beta$ -グルカンの生成量を表1に示した。

#### 【0028】

##### 【表1】

2日後または3日後に脾臓を摘出してその重量及び細胞数を測定した。さらに腹浸出細胞及び血液を取り出して腹浸出細胞数および血中の細胞数を測定した。また腹浸出細胞を用いて蛍光標識したビーズの取り込み能およびリソソーム酸性ホスファターゼ活性を測定するとにより、腹浸出細胞の食作用活性を測定した。そして実施例2と同様に対照群との比較を行った。その結果を表3～6に示した。表3～6にみられるように、本発明の高分岐度β-グルカンを経口投与すると無

\*に増加し、細胞数も1.8倍に増加した。また腹浸出細胞および血中リンパ球数はそれぞれ投与後3日目に3.4倍及び1.4倍に増加した。腹浸出細胞のマクロファージのビーズの取り込み能は1.2倍に増加し、ホスファターゼ活性も2.2倍増加したことより食作用活性が増大したことが分かった。これらより免疫賦活活性が著しく増強されたものと判断される。

【0033】

【表3】

本発明高分岐度β-グルカンの脾臓の全重量と細胞数の増加効果

グルカン	投与量 mg/体重kg	重 量		細 胞 数	
		2日後 mg	3日後 mg	2日後 個/mg	3日後 個/mg
対 照	0	133	133	$1.8 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$
本発明グルカン	20	265	214	$3.2 \times 10^8$	$2.6 \times 10^8$

【表4】

20

腹浸出細胞数および血中リンパ球数

グルカン	投与量 mg/体重kg	腹浸出細胞数		血中リンパ球	
		2日後 個/mL	3日後 個/mL	2日後 個/mL	3日後 個/mL
対 照	0	$2.6 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$
本発明グルカン	20	$6.0 \times 10^6$	$8.8 \times 10^6$	$6.7 \times 10^6$	$6.6 \times 10^6$

【表5】

腹浸出細胞中のビーズの取り込み能

グルカン	投与量 mg/体重kg	取り込み能 % 3日後
対 照	0	71
本発明グルカン	20	82

【表6】

腹浸出細胞中のマクロファージのリソソーム酸ホスファターゼ活性

グルカン	投与量 mg/体重kg	リソソーム酸ホスファターゼ活性 (相対活性)	
		2日後	3日後
対 照	0	1	1
本発明グルカン	20	1.3	2.2

【0034】

種移植腫瘍 Sarcoma 180を腹部皮下に細胞 $5 \times 10^6$ 移植

【実施例4】ICRマウス(雌、約30g)7～8匹に同 50 し、その直後から実施例2で用いた高分岐度β-グルカ

ンの生理食塩水を所定量強制的に経口投与するかあるいは腹腔内に投与して飼育した。飼料及び水は自由に摂取させ、グルカン投与後5週目に体重を測定し、さらに腫瘍を摘出してその重量を測定した。そして実施例2と同\*

\* 様に対照群と比較を行った。その結果を表7～表9に示した。

【0035】

【表7】

高分岐度 $\beta$ -グルカンによる腫瘍増殖抑制効果

投与方	投与量 mg/体重kg	固形腫瘍重量 g	固形腫瘍 抑制率%	完全 退縮数	延命率 %
対 照	0	5.23	0	0/8	13
腹腔内投与	25	2.56 $\pm$ 2.32	51	1/7	86
経口投与	90 180	2.03 $\pm$ 2.23 6.98 $\pm$ 3.46	61 -44	1/7 0/7	71 71

【表8】

腹水腫瘍化マウス数および採取量

投与方法	投与量 mg/体重kg	腹水腫瘍化率 %	腹水採取量 (平均値)ml
対 照	0	88	21.5
腹腔内投与	25	14	0.5
経口投与	90 180	29 29	15.6 11.6

【表9】

マウスの体重増加量

投与方法	投与量 mg/体重kg	マウスの数 (移植直後→35日目)	体重増加量 g
対 照	0	8→1	3.3 (1)
腹腔内投与	25	7→6	10.6 (2.4)
経口投与	90 180	7→5 7→5	5.4 (1.6) 5.7 (1.7)

【0036】表7～表9にみられるように、本発明の高分岐度 $\beta$ -グルカンを体重kg当り90mg経口投与すると無投与(対照)にくらべて固形腫瘍の増殖を61%に抑制し、また延命率を対照が13%であったのに対し、71%に高めることができた。また対照が腹水腫瘍化率が88%であったのに対し、その腫瘍化率を29%に低下させることができた。そして、この体重の増加は免疫を担当する脾臓の重量の増加によることから免疫賦活活性がいちじるしく増強されたものと判断される。

【0037】

【実施例5】

(1) 実施例1で得られた高分岐度 $\beta$ -グルカン5mgを生

は免疫増強剤とした。

(2) 実施例1で得られた高分岐度 $\beta$ -グルカン5mgを乳糖50mg、マンニトール、ブドウ糖と混合し、打錠を行って錠剤とした。

(3) 実施例1で得られた高分岐度 $\beta$ -グルカンの沈澱20gをウシ配合飼料1kgに添加してウシの免疫を増強し、感染症を防止した。

【0038】

【発明の効果】本発明によれば、新規な高分岐度を有する $\beta$ -グルカンを簡単な培養で収率よく量産することができる。そして得られる高分岐度 $\beta$ -グルカンは経口投与により高い抗腫瘍活性及び免疫賦活活性を有するのでヒトの癌予防あるいは治療薬または家畜、ペット動物、養殖魚等の感染症予防あるいは治療薬等として有用であ

る。

【図面の簡単な説明】

【図1】 高分岐度 $\beta$ -グルカンの2次元NMRスペクトルを示す。

【図2】 図1の2次元NMRを拡大したスペクトルを示す。

【図3】 図1の2次元NMRを拡大したスペクトルを示す。

【図4】 高分岐度 $\beta$ -グルカンのDMSO可溶分及び不溶分のNMRスペクトルを示す。

\*10

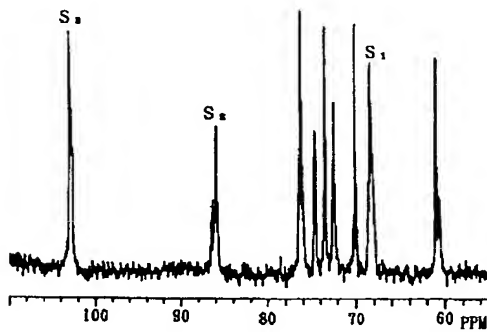
\*【図5】 高分岐度 $\beta$ -グルカンの赤外吸収スペクトル(KBr法)を示す。

【図6】 実施例4の高分岐度 $\beta$ -グルカンの投与と延命率との関係を示す。

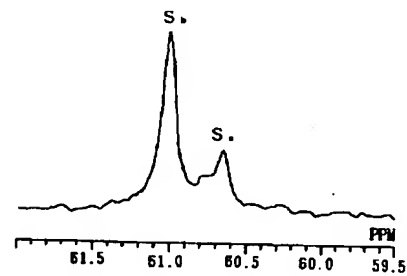
【符号の説明】

- 対照
- ◇ 経口投与(90mg/kg)
- ◆ 経口投与(180mg/kg)
- 腹腔内投与(25mg/kg)

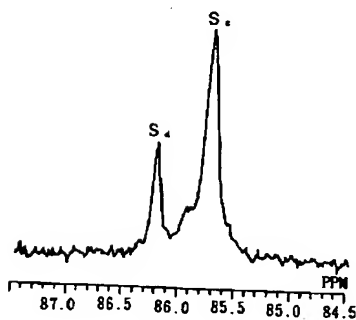
【図1】



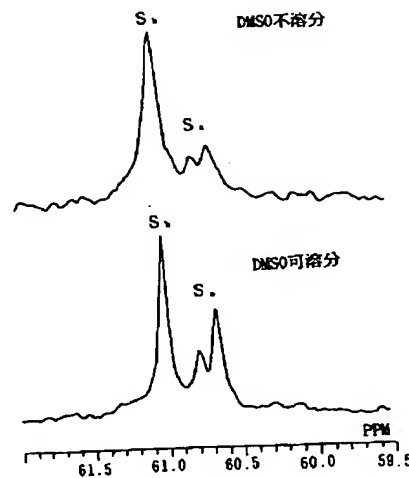
【図2】



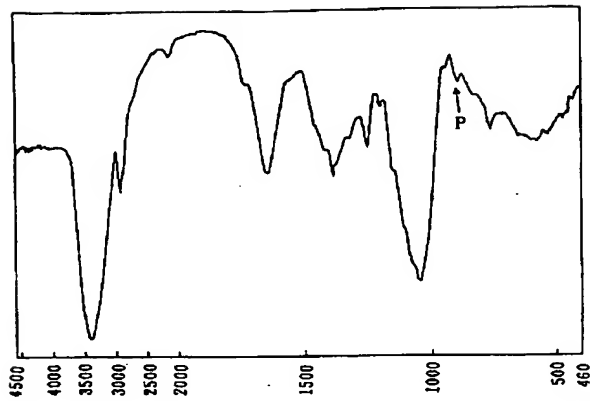
【図3】



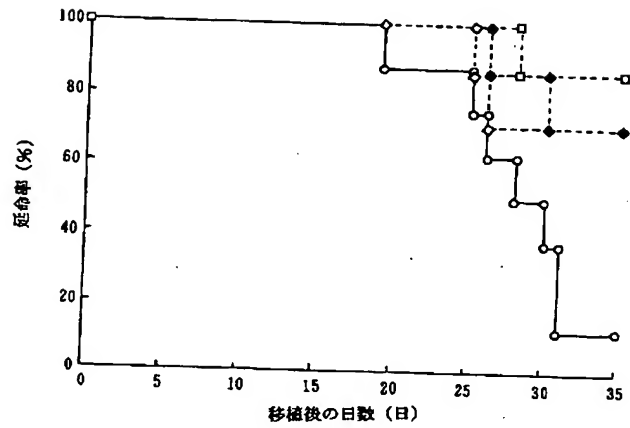
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	弁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/715	A D Z			
C 1 2 P 19/04		7432-4B		
//(C 1 2 P 19/04				
C 1 2 R 1:645)		7804-4B		

(72)発明者 八木下 和宏  
 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石  
 油株式会社中央技術研究所内